

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
JEAN ALBERTO ZANGHELINI

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PIRAMIDAÇÃO DOS LOCOS *RUN1* E *REN3*
SOBRE A RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM VIDEIRA**

Curitibanos

2015

JEAN ALBERTO ZANGHELINI

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PIRAMIDAÇÃO DOS LOCOS *RUN1* E *REN3*
SOBRE A RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM VIDEIRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Agronomia, Campus Curitibanos
da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leocir José Welter
Co-orientador: Fernando Sanchez Mora

Curitibanos

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zanghelini, Jean Alberto

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA PIRAMIDAÇÃO DOS LOCOS RUN1 E
REN3 SOBRE A RESISTÊNCIA AO OÍDIO EM VIDEIRA / Jean
Alberto Zanghelini ; orientador, Leocir José Welter ;
coorientador, Fernando Sanchez Mora. - Curitiba, SC,
2015.

21 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Melhoramento de plantas. . 3.
Resistência genética.. 4. Erysiphe necator .. 5.
Marcadores moleculares. . I. Welter, Leocir José . II.
Mora, Fernando Sanchez . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Agronomia. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

JEAN ALBERTO ZANGHELINI

Determinação do Efeito da Piramidação dos Locos *Run1* e *Ren3* sobre a Resistência ao Oídio em Videira

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a): Leocir José Welter

Data da defesa: 26/11/2015

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Leocir José Welter

Titulação: Doutor

Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas

Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Luciano Picoletto

Titulação: Doutor

Área de concentração em Agronomia

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Lirio Luiz dal Vesco

Titulação: Doutor

Área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	16
2.2 ANÁLISE GENOTÍPICA	12
2.2.1 Extração e quantificação do DNA	12
2.2.2 Amplificação dos marcadores microssatélites através da PCR (Polymerase Chain Reaction).....	12
2.2.3 Genotipagem no Applied Biosystems 3500 XL	12
2.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO OÍDIO	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 AVALIAÇÃO GENOTÍPICA.....	14
3.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA.....	14
4 CONCLUSÕES	12
ABSTRACT.....	13
REFERÊNCIAS.....	19

Determinação do efeito da piramidação dos locos *run1* e *ren3* sobre a resistência ao oídio em videira.

Jean Alberto Zanghelini

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da piramidação dos locos de resistência *Run1* e *Ren3* sobre a resistência genética ao oídio da videira (*Erysiphe necator*). Foram utilizadas duas populações segregantes para a doença, totalizando 221 plantas. Através da seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) as plantas foram selecionadas de acordo com a presença ou ausência dos locos. Foi obtida uma cópia das populações através de multiplicação vegetativa e implantada em casa de vegetação na Estação Experimental da Epagri em Videira/SC. Durante os ciclos vegetativos de 2014-15 e 2015-16 todas as plantas foram avaliadas de acordo com o nível de resistência. O nível de resistência foi determinado empregando uma escala de notas descrita por OIV-452 (ANONYMOUS, 1983), sendo a nota 1 plantas com esporulação muito baixa e 9 esporulação muito alta. A presença dos locos *Run1+Ren3* piramidados proporcionou uma alta resistência com uma nota média igual a 1,21, próximo da nota obtida para as plantas contendo apenas o loco *Run1*, com 1,23. Para as plantas contendo apenas o loco *Ren3* a nota foi 5,82 conferindo resistência intermediária a doença. A maior suscetibilidade foi observada nas plantas sem nenhum loco de resistência, com nota média igual a 7,21. A SAM permitiu identificar 68 plantas carregando os dois locos de resistência (*Run1+Ren3*), podendo utilizar estas em cruzamentos para a obtenção de novas variedades. Estes resultados indicam também que o loco *Ren3* confere baixa resistência, porém quando utilizado na piramidação pode tornar esta resistência mais durável, dificultando a quebra de resistência por parte do patógeno.

Palavras chave: Melhoramento de plantas. Marcadores moleculares. Resistência genética. *Erysiphe necator*.

1 INTRODUÇÃO

A viticultura no Brasil ainda é uma atividade relativamente recente, quando comparada com a Europa, pois esta já possui um longo histórico na produção de uva, em especial na produção de vinhos finos (MELLO; PROTAS, 2003). Porém, no Brasil, o aumento da produção de vinhos e o consumo da uva *in natura* faz com que a cultura venha conquistando espaços no cenário econômico (NERONI, 2009). Segundo dados da FAO em 2012 o Brasil esteve em 12º colocado na produção mundial de uvas. Ocupa uma área em torno de 81 mil hectares, sendo estes vinhedos distribuídos do extremo sul até as regiões próximas à linha do Equador (IBGE, 2013). No país, o principal produtor de uva é o estado do Rio Grande do Sul, com uma produção de 807.693 toneladas no ano de 2013, sendo esta destinada ao consumo *in natura* e à produção de vinhos, sucos, geléias, entre outros processados (IBGE, 2013).

Dentro deste contexto, novas regiões produtoras de uva no Brasil vêm se destacando, como a viticultura em regiões tropicais. Com destaque para a região do Submédio do São Francisco, região semi-árida nordestina, onde além de uvas para mesa, vem desenvolvendo vinhos de alta qualidade. Porém nesta região o oídio se destaca como um dos maiores problemas na produção, por caracterizar-se como uma região de clima seco pode ocorrer o ano todo. (BARBOSA et al., 2010). Outras regiões tropicais produtoras de uva podem ser citados como o noroeste Paulista e o norte de Minas Gerais. Além disto nos últimos anos, a viticultura tropical expandiu-se por outros Estados, sendo estes o Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Rondônia, Ceará e Piauí (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

As variedades europeias (*V. vinifera*), ou uvas finas, apresentam uma melhor qualidade de fruto para a produção de vinhos finos. O Rio Grande do Sul no ano de 2014 foi responsável por uma produção de 19.280.199 milhões de litros de vinhos e espumantes elaborados (UNIVIBRA, 2014). As variedades europeias são, no entanto, muito susceptíveis ao ataque de patógenos, dentre estes, destaca-se o oídio da videira (*E. necator*). Já as variedades americanas e Euro-asiáticas são consideradas fontes de inúmeros caracteres de interesse, especialmente genes de resistência a inúmeros patógenos (MORA, 2014; UNIVIBRA, 2014).

A produtividade tanto qualitativa quanto quantitativamente da videira está sujeita a um número elevado de doenças fúngicas, as quais podem em determinadas condições inviabilizar o cultivo. Entre estas, uma das doenças fúngicas que vem causando danos é o oídio, estando entre as principais doenças que atacam a videira no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2005). É considerada a mais difundida e destrutiva doença de videiras em todo o mundo, tornando-se assim o principal alvo dos fungicidas utilizados em variedades *V. vinífera* (CALONNEC *et al.*, 2004).

O oídio é conhecido como o míldio pulverulento causado pelo fungo *E. necator* (syn. *Uncinula necator*) (Schw.) Burril, forma sexuada de *Oidium tuckeri* Berk. Sua incidência está restrita principalmente a clima seco, como na região Nordeste do Brasil e Noroeste de São Paulo, onde vem sendo a principal doença fúngica da videira (Sonego *et al.*, 2005). Já na Região Sul do Brasil, não apresenta caráter epidêmico, porém em anos de baixa umidade ou em cultivo protegido pode aparecer com severidade suficiente para causar danos em variedades europeias (AMORIN; KUNIYUKI, 1997). Segundo Fathi; Karbalaei (2012), a temperatura ideal para a germinação de conídios se dá em torno de 25 °C e umidade relativa de 40-100%.

O agente patogênico infecta as folhas e frutos de plantas suscetíveis, causando uma redução da produção e qualidade da baga (BARKER *et al.*, 2005). Nas bagas, o oídio ataca desde a fixação, até estas conterem cerca de 8% de açúcar, tornando os tratamentos iniciais importantes (DURIENSE, 2012). Quando estabelecida a infecção neste estágio continuará a produzir esporos até as bagas atingirem cerca de 15% de açúcar, tornando-se imunes. Em relação às folhas, são atacadas as mais jovens, geralmente, não afetando folhas com mais de dois meses de idade. Já os brotos, pecíolos e cachos são suscetíveis durante todo o ciclo vegetativo (GARRIDO; SÔNIGO, 2003)

Segundo Stummer *et al.* (2003) altas incidências de oídio podem causar uma redução significativa de sólidos solúveis totais em videiras. Na avaliação sensorial realizada em vinhos da variedade Chardonnay, observou-se diferenças significativas em relação a atributos de aroma, Além de comprometer a qualidade do produto. Em estudo realizado por Calon nec *et al.* (2004), o oídio causou modificações no rendimento, antocianinas e teores de açúcar das bagas, já no vinho modificou as

antocianinas, taninos e os compostos que estão ligados aos aromas varietais, bem como, os efeitos pronunciados a medida em que a doença aumentava.

Segundo Alzate-Marin et al. (2005) quando se trabalha com a transferência de alelos de resistência, têm-se os marcadores moleculares como um mecanismo bastante útil. Esta ferramenta pode ser utilizada na seleção assistida por marcadores (SAM) quando ligados aos alelos de resistência. Se torna útil principalmente nas fases iniciais e intermediárias do melhoramento, uma vez que nas etapas finais as inoculações ou o contato da planta com o patógeno a campo são essenciais para confirmar a seleção indireta realizada por meio de marcadores moleculares. O uso de marcadores moleculares tem se tornado uma ferramenta indispensável quando se trabalha com melhoramento. Ultimamente tem sido empregada nas mais diversas áreas, no desenvolvimento de plantas resistentes a doenças como no feijoeiro e soja (ALZATE-MARIN et al., 2005), na identificação e geração de híbridos de eucalipto (CAIXETA et al., 2003), na caracterização da erva mate (VIDOR et al., 2012) em bovinos (SPRITZE et al., 2003) entre tantos outros.

A piramidação de genes é a acumulação de genes em uma mesma cultivar, vem sendo utilizada no desenvolvimento de cultivares com resistência mais duradoura e de amplo espectro (PEDERSEN; LEATH, 1988; ALZATE-MARIN et al., 2005; ARRUDA, 2009). Eibach et al. (2007) afirma que a seleção assistida por marcadores moleculares para o oídio da videira, pode possibilitar uma piramidação de genes de resistência, com bons resultados obtidos junto há avaliações fenotípicas uma vez que apenas esta não possibilitaria rastrear a acumulação de genes de resistência.

Ao selecionar variedades mais produtivas, o melhoramento genético melhora a qualidade industrial, melhora a adaptabilidade ecológica, torna-as mais tolerantes a estresses, possibilita aumentar os rendimentos agrícolas e mesmo reduzir o uso de insumos e produtos químicos pelo produtor, atuando na preservação da saúde e do ambiente (BRAMMER, 2000). A geração de variedades mais produtivas e resistentes aos fatores bióticos e abióticos é de grande importância, e nas últimas décadas tem sido possível devido ao melhoramento genético (CAVALCANTI, 2009). Em Curitiba foi implantando um programa de melhoramento o qual busca desenvolver variedades de videira que combinem resistência a doenças em especial ao oídio com alta qualidade enológica.

Este trabalho objetivou piramidar os locos de resistência *Run1* e *Ren3* e estimar o efeito conferido por estes sobre a resistência genética ao oídio da videira (*E. necator*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram avaliadas duas populações segregantes derivadas da polinização aberta (autofecundação) entre duas linhas de melhoramento, sendo estas a 2000-305-134 (uvas tintas) e 2000-305-97 (uvas brancas). As duas variedades são irmãs germanas, oriundas do cruzamento entre VHR 3082-1-42 e Regent (figura 1). De ambas as populações um total de 221 plantas foram avaliadas geneticamente e fenotipicamente. Quanto ao parental VHR 3082-1-42 o mesmo foi obtido do cruzamento entre *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera*, acompanhado de quatro retrocruzamentos com variedades viníferas. Este carrega o alelo de resistência *Run1*, que confere resistência total ao oídio (Pauquet *et al.*, 2001). No parental Regent foi identificado o loco de resistência *Ren3* conferindo resistência parcial ao oídio (Welter *et al.*, 2007).

As análises genéticas das populações foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV)/CCA/UFSC. Já as avaliações de resistência foram realizados na Estação Experimental da Epagri de Videira, Estado de Santa Catarina.

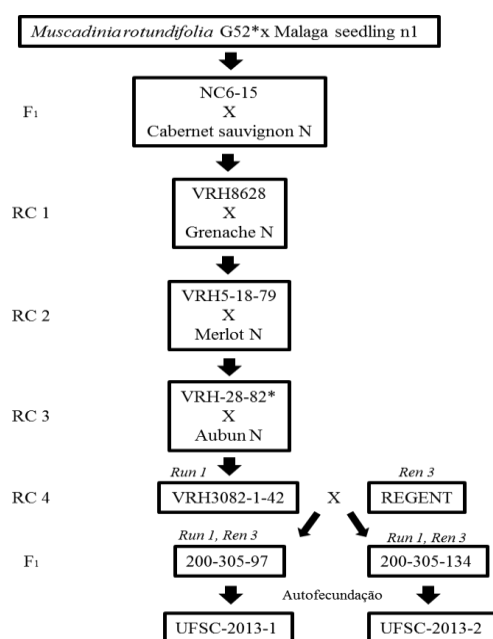


Figura 1. Diagrama apresentando a genealogia dos cruzamentos utilizados no presente trabalho (Fonte: MORA, 2014).

2.2 ANÁLISE GENOTÍPICA

2.2.1 Extração e quantificação do DNA

Inicialmente ocorreu a extração do DNA das populações estudadas, onde utilizou-se entre 80 a 100 mg de folhas já dessecadas em sílica gel, facilitando assim a maceração, a qual foi realizada em um homogeneizador Precellys® 24 em tubos com 2 mL de capacidade (self-standing microtube, Bertin Technologies) contendo quatro esferas de cerâmica de 2,8 mm, agitados durante dois ciclos de 30 segundos a 5000 rpm. Após as amostras maceradas foi utilizado para a extração do DNA o kit de extração NucleoSpin® Plant II. A quantificação das amostras de DNA foi realizada em um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) possibilitando a diluição para uma concentração $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ mantendo assim amostras com a mesma concentração para uso nas reações.

2.2.2 Amplificação dos marcadores microssatélites através da PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para a genotipagem foram utilizados dois marcadores microssatélites os quais flanqueiam o loco *Run1* localizado no cromossomo 12, e dois marcadores microssatélites localizados no cromossomo 15 que flanqueiam o loco *Ren3*. Estes marcadores foram obtidos junto ao pesquisador Dr. Rudolf Eibach*. O primer “forward” de cada marcador foi colorido com corantes fluorescentes ABI, sendo os quatro marcadores combinados em multiplex e amplificados via PCR. As reações foram realizadas com volume de 5 μL utilizando o kit KAPA 2G (Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA). As reações de PCR foram realizadas em termociclador C-1000™ Thermal Cycler (Biorad), programado em 94°C por 3 min; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 min; e um ultimo ciclo 72°C por 40 min. A confirmação da amplificação foi realizada via eletroforese em gel de agarose a 1,5 % utilizando 5 μL do produto da PCR, sendo visualizado em foto documentador de UV

*Rudolf Eibach - rudolf.eibach@jki.bund.de. Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof. Cidade: Siebeldingen. Código postal: D-76833. Germany.

2.2.3 Genotipagem no Applied Biosystems 3500

Os produtos obtidos nas reações de PCR (1 µL) foram diluídos em 27 µL de água ultrapura. Para a corrida em sequenciador utilizou-se um volume final igual a 10 µL, sendo composto por 1 µL da reação de PCR diluída, 0,5 µL do marcador Gene Scan 600 LIZ (Life Technologies) e 8,5 µL de formamida (Life Technologies). Os alelos foram separados por eletroforese capilar utilizando o sequenciador 3500 XL Applied Biosystems como polímero POP-7. O tamanho dos alelos foi obtido através da utilização do software Gene Mapper Versão 4.1 (Applied Biosystems) sendo comparado com o padrão gene scan 600 Liz (Life Technologies).

2.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO OÍDIO

Após identificado os locos presentes em cada planta através da SAM, foram realizadas avaliações fenotípicas em dois ciclos um em 2014 e o outro em 2015.

As 221 plantas (destas 189 oriundas da população UFSC-2013-1 e 32 plantas oriundas da população UFSC-2013-2) foram avaliadas quanto ao nível de resistência ao oídio. Estas plantas foram implantadas em sistema de cultivo protegido com área de 100m², construída com plástico transparente, localizada na Área Experimental da Epagri, na cidade de Videira no Estado de Santa Catarina. As plantas foram manejadas de acordo com sua exigência. O manejo de irrigação foi realizado por gotejamento evitando com isso o molhamento foliar, de acordo com a necessidade da planta. Quanto à nutrição, o solo recebeu apenas a correção da acidez, com adubações nitrogenadas de cobertura a cada 30 dias durante o período vegetativo das plantas. As plantas encontravam-se dispostas em filas simples distantes um metro entre linhas e 10-15 cm entre plantas, conduzidas no sentido vertical com uma única haste. As plantas foram mantidas durante dois anos, sendo que no segundo ciclo vegetativo as plantas foram podadas a 30 cm do solo, sendo realizados dois tratamentos com Thiametoxan (Actara) para controle de cochonilhas (*Planococcus citri*).

Buscando favorecer a infecção do patógeno, ramos contendo esporos da doença foram distribuídos no interior da estufa no mês de novembro de 2013. Em fevereiro dos anos de 2014 e 2015, as plantas foram avaliadas quanto ao nível de resistência ao oídio, conforme a quantidade de esporulação da doença que as

plantas apresentaram. Nestas avaliações foram levadas em consideração folhas presentes no terço médio das plantas, uma vez que, folhas com mais de dois meses de idade se tornam tolerantes a doença e folhas muito jovens ainda não apresentam esporulação visível. Para a avaliação foi utilizada uma escala de notas descrita por OIV-452 (ANONYMOUS, 1983), onde cada nota correspondeu a uma intensidade de esporulação da doença:

- 1) Esporulação muito baixa: Pequenos pontos ou nenhum sintoma, nem visível;
- 3) Esporulação baixa: (manchas limitadas < 2 cm de diâmetro, limitada esporulação e micélio; a presença de *E. necator* só é indicada por uma ligeira ondulação do limbo foliar);
- 5) Esporulação média: (manchas normalmente limitada com diâmetro de 2-5 cm);
- 7) Esporulação alta: (vastas manchas, algumas limitadas, forte e esporulação abundante micélio);
- 9) Esporulação muito alta: (manchas muito vastas ilimitadas com a lâmina foliar totalmente atacada, forte esporulação e abundante micélio);

A densidade de esporulação avaliada para cada nota também pode ser visualizada na Figura 2. As avaliações foram realizadas em fevereiro dos anos de 2014 e 2015.

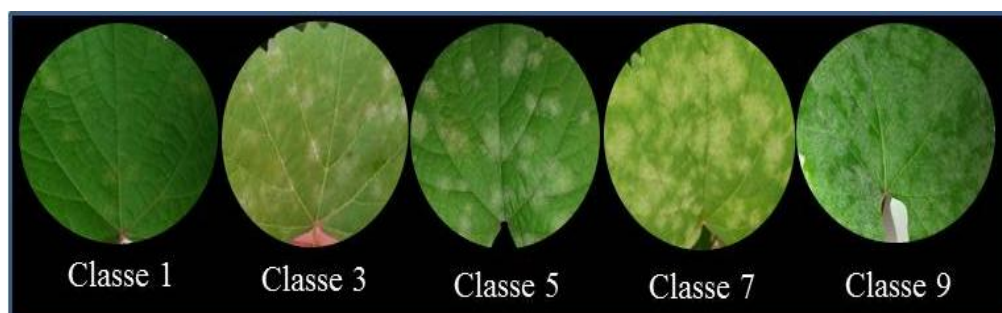


Figura 2: Representação do nível de esporulação da doença utilizado para a classificação de cada planta dentro das classes de resistência definidas pelo descritor OIV-452 (ANONYMOUS, 1983).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO GENOTÍPICA

Nas avaliações moleculares com os quatro marcadores microssatélites ligados aos locos de resistência *Run1* e *Ren3* (dois marcadores flanqueando cada um dos locos) permitiu classificar as plantas conforme os alelos de resistência que estas apresentaram. As plantas foram consideradas como positivas para a resistência, quando os dois marcadores microssatélites apresentavam os alelos originalmente ligados aos locos de resistência.

Considerando apenas a presença dos locos de resistência, não levando em consideração se estão em homozigose ou heterozigose, 12 plantas (5,5%) não apresentaram nenhum dos alelos de resistência nos dois locos, 29 plantas (13%) apresentaram apenas *Run1*, 55 plantas (25%) carregavam apenas *Ren3* e 125 plantas (56,5%) apresentaram os dois locos de resistência piramidados, dando um total de 221 plantas avaliadas genotipicamente (Tabela 1)

Tabela 1. Número e percentual de plantas contendo os locos de resistência ao oídio em 221 plantas oriundas das populações experimentais UFSC-2013-1 e UFSC-2013-2.

Locos	<i>Run1+Ren3</i>	<i>Ren3</i>	<i>Run1</i>	Nenhum loco
Nº plantas	125	55	29	12
% plantas	56,5	25	13	5,5

3.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

Em fevereiro de 2014, um total de 127 plantas foram avaliadas visualmente quanto á resistência ao oídio, sendo que entre estas, 69 continham os locos de resistência *Run1+Ren3* piramidados, 20 continham apenas o loco *Run1*, 30 continham o loco *Ren3* e oito não apresentavam nenhum dos locos (Figura 3). Noventa por cento das plantas contendo os dois alelos de resistência piramidados foram distribuídas na Classe 1, 5% na classe 3, 2% na classe 5 e 3% na classe 7. De forma muito similar, as plantas contendo apenas o alelo *Run1*, estiveram majoritariamente representadas na Classe 1 (90%), e nas classes 3 e 5, com 5% em

cada classe. Contrastando, as plantas carregando apenas o alelo *Ren3* estiveram representadas com apenas 10% na classe 1, 25% na classe 3, 40% na classe 5 e 25% na classe 7. Já as plantas com nenhum dos alelos de resistência foram as mais suscetíveis à doença, sendo enquadradas nas classes 5, 7 e 9, com 50, 30 e 20%, respectivamente.

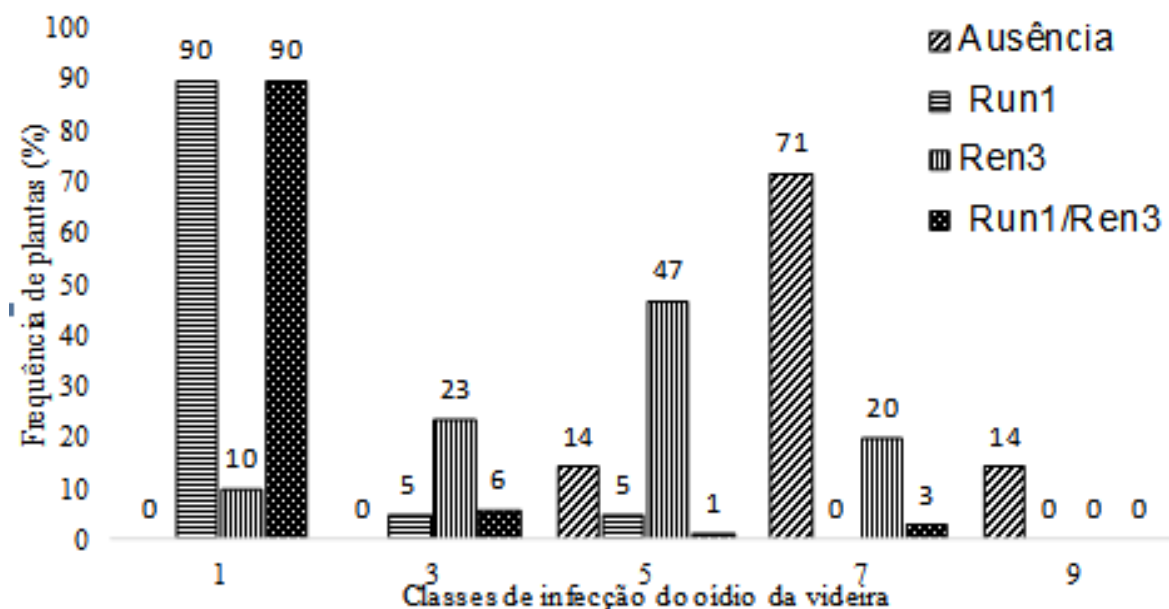


Figura 3. Frequência de distribuição das plantas de cada uma das classes genotípicas (*Run1* + *Ren3*, *Run1*, *Ren3* e ausência) nas classes de infecção do oídio da videira, onde 1: sem esporulação e 9: elevada esporulação), baseadas na escala de notas descrita por OIV-452 (ANONYMOUS, 1983), para o ciclo 2013/2014.

Em fevereiro de 2015 foram avaliadas 201 plantas quanto à resistência ao oídio, onde, 123 continham os locos *Run1*+*Ren3* piramidados, 27 continham apenas o loco *Run1*, 39 continham apenas o loco *Ren3* e 12 não apresentavam nenhum dos locos de resistência.

De modo geral, os resultados são semelhantes aos obtidos no ano anterior. Neste ciclo as plantas contendo os dois locos de resistência combinados e as que carregam o alelo *Run1* foram distribuídas entre as classes de notas 1, 3, 5 e 7, sendo que na nota 1 estão concentrados 94,30% e 89,28% das mudas contendo os locos *Run1*+*Ren3* e *Run1*, respectivamente (Figura 4). As plantas contendo o loco *Ren3* encontraram-se distribuídas em todas as classes de resistência, sendo que 65,95% das plantas estão dentro das classes de resistência 5 e 7, conferindo nível intermediário de resistência. Quando avaliada as plantas com ausência dos locos de resistência, observou-se que as mesmas encontravam-se distribuídas nas

classes 3, 5, 7 e 9, concentrando 75% nas classes 7 e 9, ou seja, altamente suscetíveis sensíveis doença.

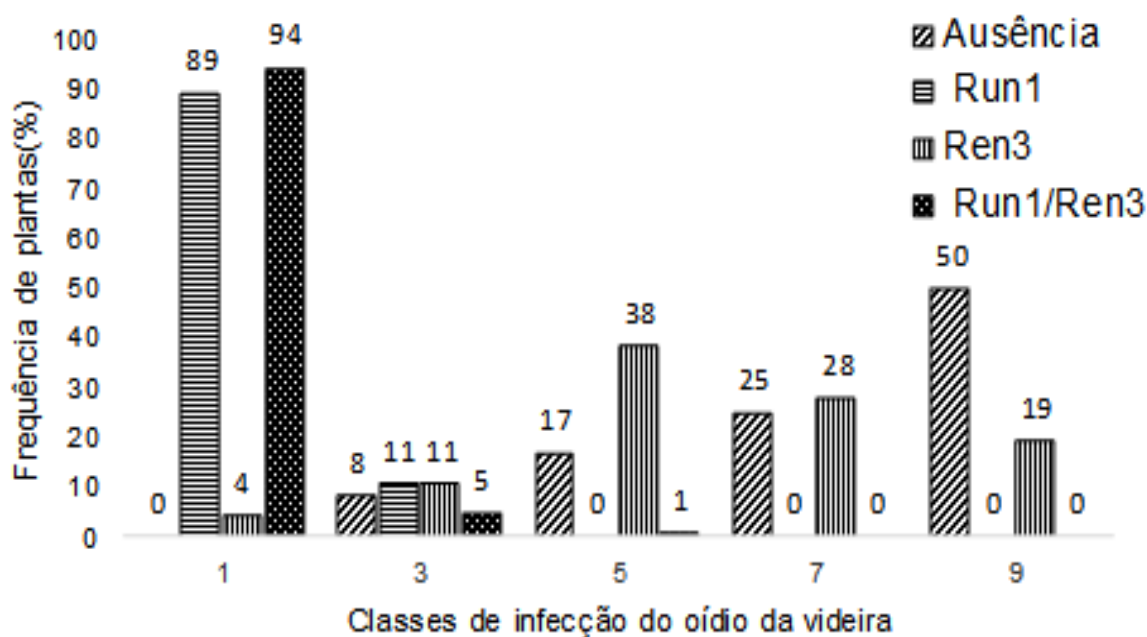


Figura 4. Frequência de distribuição das plantas de cada uma das classes genotípicas (*Run1* + *Ren3*, *Run1*, *Ren3* e nenhum loco) nas classes de infecção do oídio da videira, onde 1: sem esporulação e 9: elevada esporulação), em relação aos genes presentes em cada planta, baseadas na escala de notas decrita por OIV-452 (ANONYMOUS, 1983), para o ciclo 2014/2015.

Buscando validar os resultados obtidos referente a resistência de cada uma das plantas foi possível selecionar um grupo contendo 117 plantas que foram avaliadas nos dois ciclos, podendo assim obter uma média entre as duas avaliações, com isso gerando resultados mais precisos, os quais são apresentados na tabela 2. Em ambos os anos podemos verificar que destas 117 plantas, 68 apresentaram os locos piramidados *Run1*+*Ren3*, estando 89,7% dentro da classe 1; 20 plantas apresentaram o loco *Run1* estando 90% dentro da classe 1; 22 plantas contendo o loco *Ren3*, estando 45,45 dentro da classe 5; e por último sete plantas não apresentaram nenhum dos locos de resistência estando 57,14% dentro da classe sete.

Tabela 2. Plantas agrupadas de acordo com o loco de resistência. Número e porcentagem dentro de cada classe de nota.

Locos de Resistência	Classes de Resistência									
	Nota 1	%	Nota 3	%	Nota 5	%	Nota 7	%	Nota 9	%
<i>Run1+Ren3</i>	61	89,65	5	7,35	2	2,94	0	0	0	0
<i>Run1</i>	18	90	2	10	0	0	0	0	0	0
<i>Ren3</i>	0	0	1	4,54	10	45,45	7	31,82	4	18,18
Nenhum	0	0	0	0	1	14,28	4	57,14	2	28,57

Em ambos os anos os resultados foram positivos em relação à piramidação de locos (Figura 5), pois pode-se notar que a presença dos locos *Run1+Ren3* nas plantas fez com que estas apresentassem maior resistência obtendo uma média da nota entre os dois ciclos de avaliação igual a 1,21. Da mesma forma, as plantas contendo o loco *Run1* também apresentaram resistência elevada a doença, com média de 1,23. Contrariamente, as plantas contendo o loco *Ren3* apresentaram nota média de 5,82, ou seja, conferindo apenas resistência intermediária à doença. A maior suscetibilidade foi observada nas plantas com ausência dos dois locos de resistência, com nota média de 7,21.

Em soja Maphosa et al., (2012) obteve bons resultados com relação a piramidação de genes homozigotos *Rpp2Rpp2* x *Rpp3Rpp3*, aumentando claramente a resistência contra a ferrugem asiática, tendo a contribuição aditiva de todos os genes de resistência, porém de forma desproporcional, ocorrendo o mesmo que para os locos *Run1* e *Ren3*.

Através da seleção assistida por marcadores moleculares associados a avaliações fenotípicas, Zhang et al., (2010) identificaram 17 linhas homozigotas as quais carregavam os genes o2 e o16 combinados, e estão relacionados com a alta produção de lisina na cultura do milho.

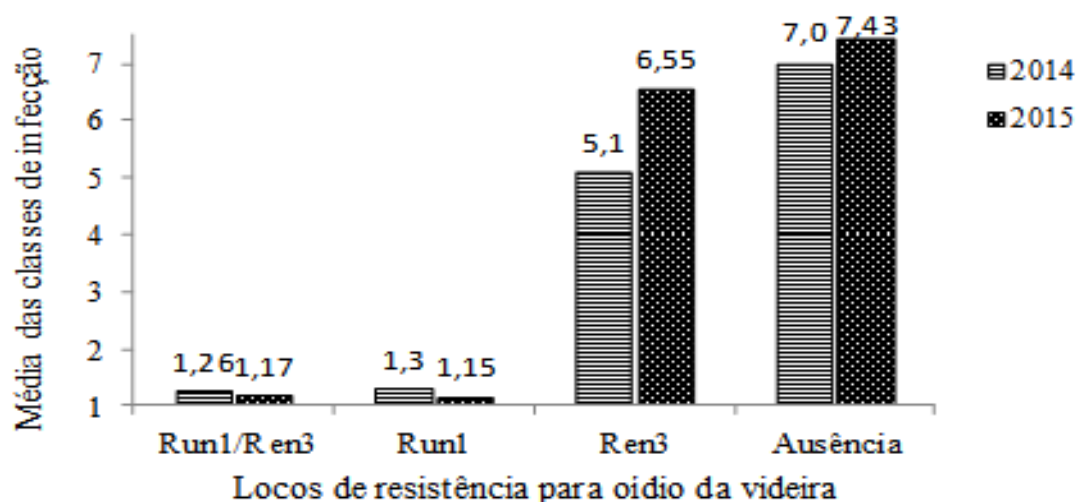


Figura 5. Média das classes de infecção em relação aos locos de resistência presentes em cada planta avaliada em ambas as safras.

A Figura 6 demonstra visualmente o que significa a planta conter os locos de resistência. As plantas A e B foram avaliadas no mesmo ambiente onde foram realizadas as avaliações das demais plantas, ou seja, um ambiente já infectado com a doença. A planta A, carrega os dois locos de resistência pirâmidados (*Run1*+*Ren3*), podendo notar que não a incidência da doença sobre esta. Ao lado encontra-se a planta B, a qual carrega apenas o loco de resistência *Ren3*, sendo visível a incidência da doença, através de uma esporulação bastante alta, sendo considerada suscetível ao oídio da videira.

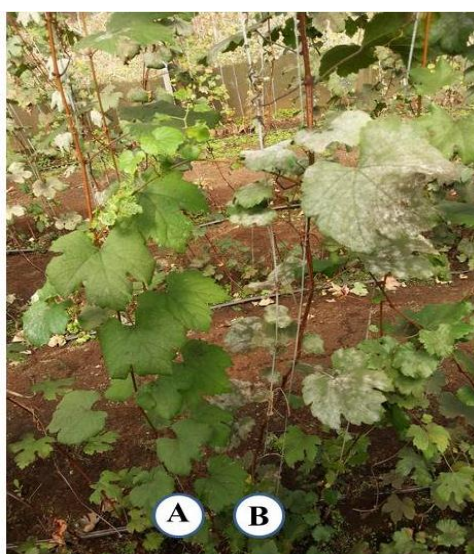


Figura 6. Planta A e B contendo os locos *Run1*+*Ren3* e *Ren3*, respectivamente, implantadas em casa de vegetação.

4 CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível selecionar 68 plantas contendo os locos de resistência *Run1* e *Ren3* piramidados. Estes materiais deverão futuramente ser avaliados quanto á qualidade enológica. Além disto, podem ser utilizados também para a realização de novos cruzamentos com variedades que apresentem importância para a cadeia produtiva da uva no Brasil, pois as progênies herdarão os locos de resistência contra o oídio da videira.

Evidenciou-se com isso que o loco de resistência *Run1* confere resistência completa ao oídio. Deste modo, a piramidação dos locos de resistência *Run1+Ren3*, não acrescentou na resistência ao oídio, porém, mesmo que o *Ren3* confere apenas resistência parcial, a piramidação dos locos é interessante, pois esta contribui para o aumento da complexidade da resistência, dificultando a quebra da resistência por parte do patógeno.

Com o plantio desta(s) variedade(s), será possível minimizar a aplicação de fungicidas, diminuindo assim os custos de produção, aumentando os lucros em ate 30%. Outro fator se da na qualidade do produto final, o vinho, pois este não apresentará resíduos dos fungicidas. Além disso, a saúde do agricultor ou funcionário que trabalhará no manejo do vinhedo, assim como o meio ambiente, não estarão expostos a estes produtos químicos.

Determination of pyramiding effect of *Run1* and *Ren3* loci on the powdery mildew resistance in grapevine

Jean Alberto Zanghelini

ABSTRACT

The objective of this study was evaluate the effect of loci pyramiding of resistance loci *Run1* and *Ren3* responsible for the grapevine Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) genetic resistance. Were utilized two segregating populations to evaluate the disease, totalizing 221 plants. Through molecular markers selection (MMS), plants were select accordingly with presence or absence of the loci. From the original population we obtained one copy through vegetative propagation, and implanted at the Green House in the Epagri Experimental Station in Videira/SC. During the vegetative cycles of 2014-15 and 2015-16, all plants were evaluated accordingly with the resistance level. The resistance level was determined using the grades scale described for OIV-452 (ANONYMOUS, 1983), representing grade 1 for plants with very low sporulation, and 9 for very high. The presence of locus *Run1+Ren3* pyramided gave a high-level resistance, with an average grade of 1, 21, closer of the grade obtained to the plants with single loci resistance single loci resistance *Run1*, with 1, 23. For the plants containing only the loci *Ren3* the grade was 5, 82, conferring intermediary resistance to the disease. The most susceptible was observed in plants without any resistance loci, with an average grade of 7, 21. The MMS allowed identify 68 plants carrying both resistance loci (*Run1+Ren3*), with potential to utilize this crosses to obtain new varieties. These results also indicated that the loci *Ren3* gives a low resistance alone, but when utilized in pyramiding can turn the resistance more stable, making difficult to the pathogen to break it.

Key words: Plant Breeding, molecular markers, genetic resistance, *Erysiphe necator*

REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 4, n. 30, p.333-342, 2005.
- AMORIN, L; KUNIYUKI, H. Doenças da videira. In; KIMATI, A. et. Al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1997.
- ANONYMOUS. **Descriptor list for grapevine varieties and *Vitis* species**. Office International de La Vigne et du Vin (OIV), Paris, 1983.
- ARRUDA, K. M. A. **Piramidação de genes de resistência à antracnose, ferrugem e mancha angular e estudos de alelismos em feijão comum**. 2009. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- BARBOSA, M. A. G. et al. **Cultivo da Videira**. 2. ed. [si]: Embrapa, 2010.
- BARKER, C. L. et al. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. **Theor Appl Genet**. v. 111, n. 2, p.370-377, 2005.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: Princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. 03. ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 12 p.
- CAIXETA, R. P. et al. VARIAÇÕES GENÉTICAS EM POPULAÇÕES DE *Eucalyptus* spp. DETECTADAS POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, v. 27, n. 3, p.357-363, 2003.
- CAMARGO, U A., TONIETTO, J., HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**., [s.l.], v. 33, n. 1, p.144-149, 2011.
- CALONNEC, A. et al. Blackwell Publishing, Ltd. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. **Plant Pathology, Villenave D'ornon**, v. 53, n. 1, p.434-445, 2004.
- CAVALCANTI, J. J. V. Anais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 2009, Fortaleza. **Importância da seleção assistida por marcadores moleculares**. Fortaleza: Cbfv, 2009. v. 1, p. 0 - 1 , 2009.
- DURIENSE, Advid- Associação Para O Desenvolvimento da Viticultura. **Oídio da videira**. 2012. Disponível em: <<http://www.advid.pt/imagens/cadernos/13992819204135.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2015.
- EIBACH, R.; ZYPRIAN, E.; WELTER, L. J.; TÖPFER, R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **Vitis**, v.46, p.120-124, 2007.
- FAO. Food and Agricultural commodities production, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 23. set. 2015.
- FATHI, H., KHIAMI, H. K. Study of biology and epidemiology of *Uncinula necator* caused powdery mildew disease. **Technical Journal Of Engineering And Applied Sciences**. Meshkinshahr, v.2, n.3, p. 56-61, 2012.

GARRIDO, L. R., SÔNEGO, O. R. Doenças Fúngicas e Medidas de Controle. In: PROTAS, José Fernando da Silva. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Lavoura Permanente 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>> Acesso em: 23 de set 2015.

MELLO, L. M. R., PROTAS, J. F.S. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

MORA, F. D.S. **Seleção assistida por marcadores moleculares na piramidação de genes de resistência ao míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Erysiphe necator*) em videira**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado) – em Recursos genéticos vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

NERONI, R. C. **Amarelos da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização dos agentes causais**. 2009. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Fitopatologia, Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

OLIVEIRA, P.R.D., SCOTTON, D.C., NISHIMURA, D.S., FIGUEIRA, A. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n. 3, p.454-457, 2005.

PAUQUET, J., BOUQUET, A., THIS, P., ADAM-BLONDON, A. F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics** v.103, p. 1201-1210, 2001.

PEDERSEN, Wayne L.; LEATH, Steven. PYRAMIDING MAJOR GENES FOR RESISTANCE TO MAINTAIN RESIDUAL EFFECTS. **Revista Phytopathol**, Urban, v. 26, n. 1, p.369-378, 1988

SÔNEGO, Olavo Roberto; GARRIDO, Lucas da Ressurreição; GRIGOLETTI Junior, Albino. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**: Circular Técnica 56. 2005.

SPRITZE, Álvaro et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 10, p.1157-1164, 2003.

STUMMER, Belinda e et al. The effect of powdery mildew infection of grape berries on juice and wine composition and on sensory properties of chardonnay wines. **Australian Journal Of Grape And Wine**, Glen Osmond, v. 1, n. 9, p.28-39, 2003.

UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2009a2014_dez.pdf>. Acesso em: 23 de setembro de 2015.

VIDOR, Mario Angelo et al. MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): O SABOR. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p.415-420, jan. 2012.

WELTER, L.J., GÖKTÜRK-BAYDAR, N., AKKURT, M., MAUL, E., EIBACH, R., TÖPFER, R., ZYPRIAN, E.M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** v. 20, p. 359–374, 2007.

ZHANG, W.L. et al. Molecular Marker-Assisted Selection for o2 Introgression Lines with o16 Gene in Corn. **Acta Agronomica Sinica**. v. 36, n. 8, p. 1302–1309, Jul. 2010.